

令和元年6月3日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05842

研究課題名(和文)多成分ペプチド連結法の開発とタンパク質の機能の解明

研究課題名(英文)Efficient assembly of multiple peptide segment for total chemical protein synthesis

研究代表者

大石 俊輔(Oishi, Shunsuke)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任助教

研究者番号：80707795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、化学的構造が高度に制御された生理活性システインリッチタンパク質をペプチドライゲーション法を用いて迅速かつ効率的に合成する方法論の開発およびそれらを用いたケミカルバイオロジー研究への応用である。本研究により、複数のペプチド断片の効率的に集積化により、化学合成タンパク質を得ることが可能となった。さらに本方法を植物の生理活性システインリッチタンパク質の全合成研究へと応用し、花粉勧誘因子CALL1タンパク質の全合成について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

システインリッチタンパク質は、ジスルフィド結合による会合のため、組換えタンパク質の過剰発現などのバイオテクノロジーによる手法では合成が困難である。今回、化学合成によりシステインリッチタンパク質の効率的な合成手法を確立することができた。これまで合成が困難であったため、システインリッチタンパク質の生体内での役割には未知の部分が多い。今後は生命科学者との共同研究により、これらのタンパク質の機能解明に展開する予定である。

研究成果の概要(英文)：We have developed efficient assembly of three peptide fragments by using peptide ligation reactions. Among many protein targets, we selected cysteine-rich proteins, which are difficult to produce with over-expression due to protein aggregation and important class of proteins in biology research. We studied total chemical synthesis of several cysteine rich proteins. And we are planning to apply them to biology research with collaboration with biologists.

研究分野：ケミカルバイオロジー

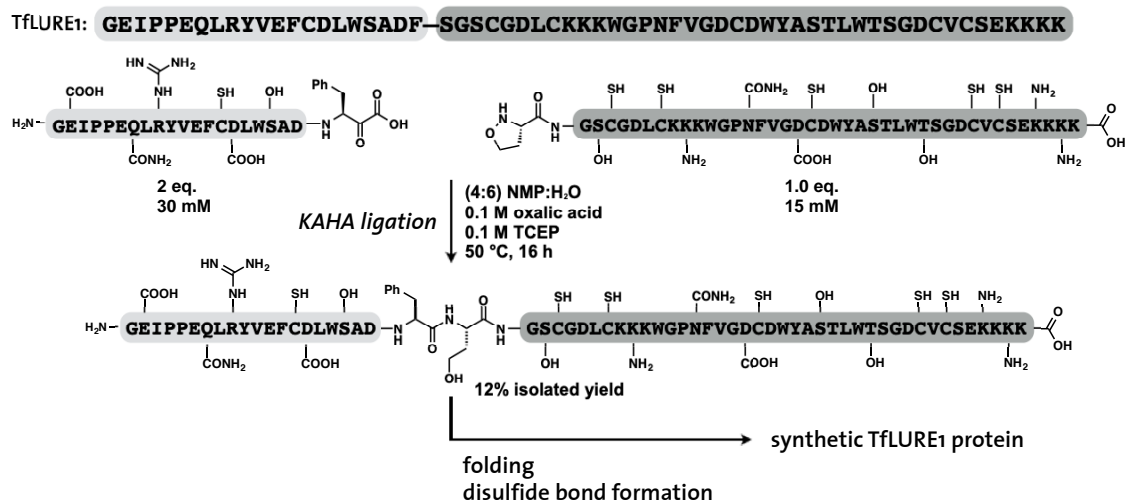
キーワード：有機合成化学 タンパク質化学 ペプチド化学 ペプチドライゲーション 生理活性物質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は生体システムの中で重要な役割を担う分子である。タンパク質の機能の多くは適切な立体構造の形成や精密な翻訳後修飾により制御される。タンパク質の構造と生体内での機能の関係や他の生体分子との相互作用を直接的に検証するためには、構造明確かつ高純度なタンパク質を十分な量合成することが必要不可欠である。しかしながら、タンパク質は多くの反応活性なアミノ酸側鎖を持つため、タンパク質の位置選択的な修飾による活性型タンパク質の合成は容易ではない。

申請者らの研究グループではこれまでにタンパク質の新たな化学合成法として KAHA ライゲーション反応を開発し、これまでに 200 残基程度のタンパク質の合成を達成した。



**TfLURE1:**



**TcLURE1:**



**Tf-TcLURE1:**



**Tc-TfLURE1:**



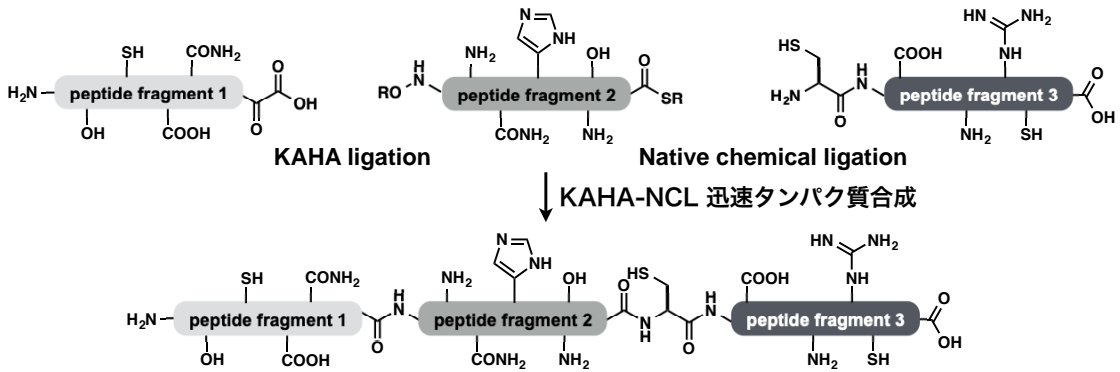
### 2. 研究の目的

本研究の目的は、化学的構造が高度に制御された生理活性システインリッチタンパク質をペプチドライゲーション法を用いて迅速かつ効率的に合成する方法論の開発およびそれらを用いたケミカルバイオロジー研究への応用である。

### 3. 研究の方法

Fmoc 固相ペプチド合成法により調製した 3 種のペプチドフラグメントを、ネイティブケミカルライゲーション (NCL) および、Keto acid-Hydroxyl amine (KAHA) ライゲーションを用いて連続的に連結することでタンパク質を迅速に化学合成する。この方法を用いて花粉管誘引タンパク質 CALL1 の全合成研究を行なった。

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)



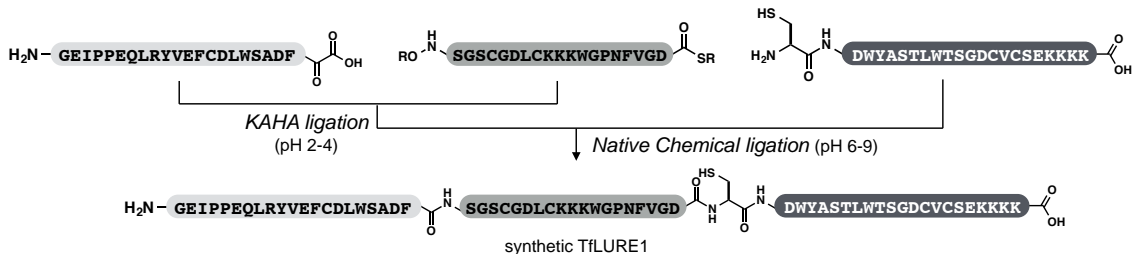
4. 研究成果

2016年度はモデル基質を用いて(1)KAHAライゲーションと native chemical ligation (NCL)の2種類のペプチドライゲーション反応の組み合わせが一つのタンパク質合成ターゲットに対して適用可能であること、(2)花粉管誘引因子である CALL1 タンパク質の化学全合成研究の2点を行った。

(1)では、モデル基質を用いた検討から、NCLに必要なC末端チオエステルとして、C末端ヒドラジドを前駆体としてカルボン酸アジドを経由してチオエステルを生成する方法が有効であることがわかった。また KAHA ライゲーションに必要なヒドロキシアミンの保護基として紫外線によって脱保護される photo-cleavable protecting group を開発した。これらを用いることで三成分連結によるタンパク質の迅速化学合成が可能であることが示された。

(2)では、(1)で得られた基礎的知見をもとに花粉管誘引因子である CALL1 タンパク質の化学全合成に必要なペプチドフラグメントの合成を行った。ペプチド固相合成の条件検討により、3つのペプチドフラグメント (CALL1-Seg1、CALL1-Seg2、CALL1-Seg3) が問題なく合成できることが明らかとなった。

TfLURE1: GEIPPEQLRYVEFCDLWSADFSGSCGDLCKKKWGNFVGD CDWYASTLWTS GDCVCSEK KKK

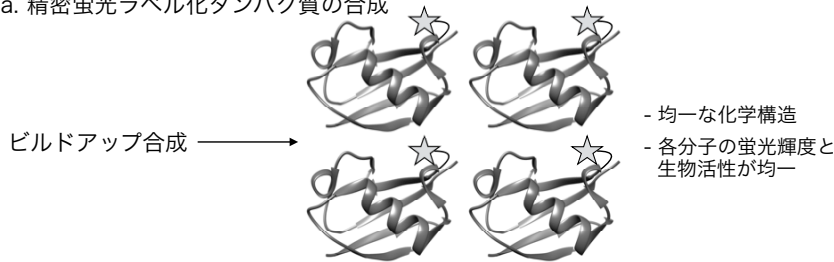


2017年度は前年度までに検討した KAHA ライゲーションと native chemical ligation (NCL)の2種類のペプチドライゲーション反応の組み合わせが花粉管誘引因子である CALL1 タンパク質の化学全合成研究に対して適用可能であることを検証した。

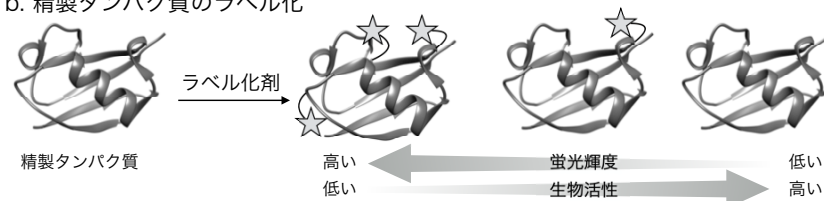
モデル基質を用いて検証した場合から、さらに反応条件や側鎖保護基を検証することにより、CALL1-Seg1、CALL1-Seg2、CALL1-Seg3の3つのペプチドフラグメントの連結に成功した。

2018年度は、ペプチドフラグメントの連結後の残りの側鎖官能基の脱保護の条件について検討

a. 精密蛍光ラベル化タンパク質の合成



b. 精製タンパク質のラベル化



した。またタンパク質の機能解析のため蛍光修飾の方法についても検討を行った。さらに他の植物由来システインリッチタンパク質の化学全合成に対しても方法を適応した合成研究を開始した。今後、CALL1の全合成とフォールディングを行い、生物活性の確認と生体での機能の解明研究を行う予定である。

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 大石俊輔「ライゲーション化学を用いた植物ケミカルバイオロジー」第3回「有用物質合成を加速する分子設計の新展開」に関する研究会 30 代研究者が切り拓くタンパク質化学合成の新潮流、静岡大学浜松キャンパス、2019年2月28日-3月1日
2. 大石俊輔「KAHA ライゲーションを用いた花粉管誘引タンパク質 LUREs の化学合成」第2回「有用物質合成を加速する分子設計の新展開」に関する研究会 生体分子を制御・可視化するケミカルバイオロジー、静岡大学浜松キャンパス、2018年5月15日

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。